云 南 植 物 研 究 1988；10（4）：389—395
Acta Botanica Yunnanica

黑节草多糖的研究*

王世林 郑光植 何静波 喻学俭 吴 玉

（中国科学院昆明植物研究所，昆明）

摘要 从黑节草（*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.）分离纯化到三种多糖：黑节草多糖Ⅰ，Ⅱ和Ⅲ。根据IR、^{1}H及^{13}C NMR、酸水解和O-乙酰基分析，确定它们为一类O-乙酰葡萄甘露聚糖。由过碘酸氧化、Smith降解、部分酸水解和甲基化分析，证明了它们由几个β-(1→3)-D-甘露吡喃糖基和一个β-(1→4)-D-葡萄吡喃糖基重复构成主链。支链可能由β-(1→4)-D-葡萄糖基和其它戊糖基组成，并连接在主链葡萄糖基的2-、3-或6-位上。用凝胶层析法测得它们的分子量($\overline{MW}$)为1 000 000(Ⅰ),500 000(Ⅱ)和120 000(Ⅲ)。

关键词 黑节草；多糖；O-乙酰葡萄甘露聚糖

黑节草（*Dendrobium candidum* wall. ex Lindl.）为加工我国珍贵高级饮料—西枫斗的原料植物之一[1]。石斛属植物是我国一类传统重要中药材，在《神农本草经》中，即列为上品[2]。对该类药材古人曾论及“嚼之有苦味，品质略次，嚼之发粘者为佳”[3]。黑节草是该属植物中少数几个粘而不苦的种之一。在化学成分的药理筛选中，发现它的多糖部分有较高的抗癌和增强免疫功能的活性，正好与古训相吻合。中医中药重视扶正固本，用于扶正固本的石斛属植物其健身延年作用的科学依据急待探索[4]。近年来复合多糖的研究越来越引起人们的极大兴趣。本文报道黑节草多糖化学结构的测定。

黑节草经甲醇弃除小分子物质，水提取物乙醇分级沉淀，得到三种多糖。用DEAE-Sephadex A-50和Sephadex G-200进行纯化，得精制多糖体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ。Sepharoes 2B凝胶柱层析分别为单峰，GF/B玻璃纤维纸电泳显色亦得到单一斑点，表明为三个单一均匀成分。其理化性质分析结果见表1。

红外光谱在890 cm^{-1}附近有吸收峰[5]，^{1}H NMR在4.7—4.4(δ)有特征峰[6]，^{13}C NMR异头碳特征峰均集中在101—105之间[7]，以上特征峰值表明这三种多糖主要以β-甙链结合。

红外光谱在1730 cm^{-1}有吸收峰，^{1}H NMR在2.16（δ）有特征峰，^{13}C NMR有22.6 ppm及175.3特征峰[7]，^{1}H NMR在5.4 ppm出现的峰被认为是含乙酰基吡喃糖

1986-07-10收稿，1988-03-08定稿
* 国家自然科学基金资助项目

残基的特征峰[8]，经纸层析、气相色谱及羟肟酸定量测定，仅检出O-乙酰基，含量(%)分别为6.58（Ⅰ），6.74（Ⅱ），7.74（Ⅲ）。故确定这三个多糖含有O-乙酰基。

表1 黑节草多糖理化性质及光谱数据

Table 1 Physico-chemical properties and data of spectra of condidumans

Property	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
$(\alpha)_D^{20}$	−20	−22	−33
O-acetyl(%)	6.6	6.7	7.7
IR(cm^{-1})	3375, 1730,	3400, 1730,	3380, 1730,
	1240, 892,	1240, 890,	1240, 887,
	873, 808.	873, 807.	870, 808.
^1H NMR(δ)	2.16, 4.42,	2.16, 4.42	2.16, 4.27,
	4.58, 4.68,	4.54, 4.68	4.44, 4.69,
	5.40.	5.40.	5.40.
^{13}C NMR(ppm)	22.6,	22.6	22.6,
	101—105*,	101—105*,	101—105*,
	175.2.	175.3.	175.3.
$\overline{MW}$	1,000,000.	500,000.	120,000.

* ^{13}C NMR用100MHz仪器分辨力不高，异头碳峰为不清晰的多重峰

采用凝胶过滤柱层析法测得分子量为Ⅰ，1 000 000；Ⅱ，500 000；Ⅲ，120 000。由于标准曲线的测定所用葡聚糖均为已知分子量的直链多糖，而样品多糖均为带支链的，故实际分子量应大于测定值。

多糖完全水解产物的气相层析结果（表2）证明样品中主要含有甘露糖（Man）和葡萄糖（Glc），并有微量阿拉伯糖（Ara）和木糖（Xyl）。红外光谱在810、870cm^{-1}附近有甘露糖的特征吸收峰[5]。^1H NMR和^{13}C NMR在糖甙键信号范围内有多个信号，证明了黑节草多糖为一类O-乙酰β型葡萄甘露聚糖。

过碘酸氧化和Smith降解产物分析（表2）表明这三个多糖主要以β-（1→3）D-甘露糖基和β-（1→4）D-葡萄糖基缩合而成，并含少量（1→2）和（1→6）连接。未氧化葡萄糖的存在，表明支链可能连接在葡萄糖基上。

多糖完全甲基化衍生物GLC与GLC-MS分析各峰值经与文献[9]一一对证，并由寡糖分析结果（表3、4）推出多糖的连接方式，证明了这三个多糖均由几个β-（1→3）D-甘露糖基和一个β-（1—4）D-葡萄糖基重复构成主链。由Smith降解出现赤

醇醇，寡糖和多糖的甲基化分析中均有少量2，3，4，6-四-O-甲基葡萄糖衍生物，表明多糖中支链可能由β-D-葡萄糖基和其它戊糖基组成，且连接在主链葡萄糖基的2-，3-或6-位上。以上结果还表明这些支链短而少，难与主链降解寡糖区分开，有待深入研究。支链的长短和连接位置不尽相同也是这三个多糖的主要差别之一。

表2　黑节草多糖组成及其Smith降解产物

Table 2 Composition of condidumans and products of Smith degradation from condidumans

	Composition				Product			
	Man	Glc	Ara	Xyl	Man	Glc	Ery	Gly
I	3.2	1	trac	trac	3	1	0.3	trac
II	5.8	1	0.1	0.1	8.4	1	1.3	trac
III	3.2	1	trac	0.1	9.4	1	2.9	trac

表3　黑节草多糖及其降解寡糖甲基化分析

Table 3 Methylation analysis condidumans and oligoses from condidumans partial hydrolisis

Methylated alditol acetate derivative	Retention[a] time	Molar ratios I	II	III	Oligose[b] derivative 2	3	4	5
2,3,4-pentitol	0.8	0.7	5	0.6				
2,3,4,6-Man	0.96	1	1	1	11.2	10	10	10
2,3,4,6-Glc	1	0.5		1				0.5
3,4,6-Glc(Man)	1.07	1	1.2	0.8				
2,4,6-Man	1.21	43	119	65.4	8.6	17	20	26
2,3,6-Glc	1.23	11	20	11.1	2.1	2.5	5	6
2,6-Glc	1.32	0.8	0.9	0.9			1	1
3,6-Glc	1.36	1.9	4	0.4			2	1
2,3-Glc	1.40	1	1.8	1.5			1	1

a) Relative to 1,5-di-o-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol.

b) 寡糖2，3，4和5分别为双糖，叁糖，肆糖和伍糖。

表 4 黑节草多糖降解寡糖克分子比及其糖组成

Table 4 Molar ratios and constituents of oligoses from condidumans partial hydrolisis

		Molar ratios				
		单糖（己糖）	双糖	叁糖	肆糖	伍糖
Ⅰ		5.3	3.3	2.7	1	0.6
Ⅱ		1.5	1	1.7	1	0.4
Ⅲ		7.6	3.7	1.4	1	0.2
组成	Man	1	10	9	3.1	4
	Glc	trac	1	1	0.9	1

实 验 部 分

IR用IR-450型分光光度计，UV用Shimadzu UV-260型分光光度计，GC用GC-9AG气相层析仪，GC-MS用Finnagan-4510型质谱仪，^{1}H NMR 用 250MHz 超导核磁共振仪，^{13}C NMR用FX-100型核磁共振仪。溶剂D_2O，温度90°C，内标DSS。

黑节草多糖的提取、分离和纯化

取黑节草1500克，用甲醇提取三次，药渣干燥后用水提取二次，水提取液离心弃渣，上清液用乙醇分级沉淀，得三种粗多糖约355.5克，得率23.7%。各取10克反复进行溶解、乙醇沉淀共五次，所得三种洁白色多糖再各取部分通过DEAE-Sephadex A-50柱（3.5×45 cm），用O—1*M*氯化钠水溶液梯度洗脱，蒽酮硫酸试剂检出，收集高峰部份，多糖主要出现在水溶液洗脱部分。氯化钠溶液洗脱部分检出物较少，弃之。将得到的多糖再分别通过Sephadex G-200柱（3.5×45 cm），用0.02*M*氯化钠溶液洗脱，收集高峰部分，乙醇沉淀、离心、无水乙醇和乙醚干燥，得三种精制多糖Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ。

多糖的鉴定

元素分析（%） Ⅰ. C，43.25；H，6.52。Ⅱ. C，43.79；H，6.55。Ⅲ. C，43.20；H，6.49。均不含氮。

三个多糖红外光谱基本相同，结果见表 1。

区带电泳 点样于Whatman GF/B玻璃纤维纸，pH 9.2的硼砂缓冲液（0.025*M*硼砂：0.1*N*氢氧化钠＝10：1 V/V）中，500V电压，2小时，α-萘酚-硫酸试剂显色，三种多糖均为单一色斑。

凝胶柱层析 用Sepharose 2B 凝胶柱层析（1.8×45），三种多糖分别上柱，上样量各为 4 mg，用0.25*M*氯化钠溶液洗脱，流速 8—10 ml/h，按每约 3 ml 体积分部收集，蒽酮法比色测定，洗脱高峰分别出现在74 ml（Ⅰ），82 ml（Ⅱ），100 ml(Ⅲ)。均为单一峰。

平均分子量测定 采用凝胶过滤法测定分子量[10]。称取已知平均分子量($\overline{M}$W) 为 2 000 000，500 000，250 000，100 000的Dextran各 5 mg，通过Sepharose 2B 凝胶柱

（1.8×90 cm）进行层析，用0.25 *M*氯化钠（含0.02%叠氮钠w/v）溶液以每小时9—10 ml的速度洗脱，每管约3 ml分部收集，蒽酮法比色测定。分别求得洗脱体积Ve，然后再用蓝葡聚糖（$\overline{M}$W＞200万）上柱，求得柱之空体积Vo，按Ve/Vo与分子量对数关系作图，得到标准曲线。然后，三个样品各5 mg分别按上述条件上柱，求得Ve，根据Ve/Vo值，查标准曲线，得到三个多糖的分子量（$\overline{M}$W）（表1）。

O-乙酰基分析　按Mccomb方法[11]，用五乙酰葡萄糖求出标准曲线。同法取Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ各10 mg放入三个25 ml容量瓶中，用5 ml水溶解，各加入2 ml新配制的试剂（2.35 *N*氢氧化钠：0.54*M*盐酸羟胺＝1：1 V/V）。摇匀放置10分钟，加入5 ml酸性甲醇液，10分钟后加高氯酸铁溶液至刻度，摇匀过滤，滤液于520 nm处测吸光度，由标准曲线给出含量（%）为6.6（Ⅰ），6.7（Ⅱ），7.7（Ⅲ）。用羟肟酸纸层析[12]进行这三种多糖所含有机酸酯的鉴定，醋酸乙酯作对照，溶剂系统：异丙醇-氨水（2：1），10%三氯化铁水溶液显色，结果三个样品都只检出与乙酰羟肟酸相同的色斑。再取三种多糖的混合样品90 mg溶于5 ml水中，加2 *N*氢氧化钠5 ml水解4小时，释放出的酸转化为甲酯，气相色谱测定，SE-54毛细管柱，30m，温度40°C，汽化200°C，FID检测，醋酸甲酯作对照，仅检出与对照相同的峰，保留时间同为4分12秒。以上结果证明样品中仅含O-乙酰基。

完全酸水解　三种多糖各取10 mg，加入2*M* 三氟醋酸（2 ml），封管于120°C水解2小时，减压蒸发至干，再加甲醇反复减压蒸发至无酸味。纸层析检测，溶剂系统：正丁醇-醋酸-乙醇-水（4：1：1：2）；醋酸乙酯-吡啶-水（10：4：3），苯胺-邻苯二甲酸试剂显色，主要色斑出现在与标样甘露糖相同位置上，并有拖尾。参照Bradbury方法[13]，水解产物各取约2 mg，溶解于稀氨水（2 ml），各加10 mg钠硼氢还原3小时，滴入醋酸使溶液呈酸性，用Dowex 50W-×8 (H^+) 树脂除去钠离子，溶液减压蒸干，再反复加甲醇蒸干共5次，所得alditols加0.1ml三甲基硅咪唑，然后进行气相色谱分析。Se-54毛细管柱，30m，定温200°C，FID检测。样品峰保留时间分别与标样甘露醇、葡萄糖醇、阿拉伯糖醇及木糖醇相一致，并根据气相层析各峰面积比算出摩尔比，结果见表2。

过碘酸氧化[14]　取三种多糖各20 mg分别加入50 ml 0.015*M*过碘酸钠溶液，室温置于暗处，每隔24小时紫外测定一次，48小时后消耗值不变，测得过碘酸消耗值为0.6*M*（Ⅰ），0.59*M*（Ⅱ），0.24*M*（Ⅲ）（以每单位脱水己糖计算）。

Smith降解[15]　取每种多糖各20 mg分别加入0.015 *M*过碘酸钠溶液50ml，室温、置于暗处，48小时后各加入2 ml乙二醇，透析二天，减压浓缩至5 ml左右，加入30 mg钠硼氢摇匀过夜，醋酸中和，透析一天，减压蒸干，加甲醇反复抽干5次，残留物各加2 *M*三氟醋酸（4 ml），封管于120°C水解2小时，减压蒸发至干，各取小体积调至碱性，用钠硼氢还原，制备成TMS衍生物，气相层析检测（同水解产物测定方法）。其峰与标样甘油、赤藓醇、甘露醇和葡萄糖醇一致。换算出的摩尔比见表2。

甲基化分析　按Hakomori方法[16]，取干燥的三种多糖各60 mg分别溶于6 ml二甲亚砜，通氮气于50°C搅拌下，各加入3 ml二甲亚磺酰阴离子，反应2小时后，冷却至20°C以下，再逐滴加入0.4 ml碘甲烷，反应在25°C以下继续2小时。重加入同等数量的

阴离子和碘甲烷，反应1小时。重复上述操作2—3次，即可获得红外检测无羟基的完全甲基化多糖。反应产物透析，氯仿提取，干燥，减压蒸除溶剂。取部分用88%甲酸100°C水解3小时，反复加水减压蒸除甲酸，残渣用1 N硫酸100°C水解16小时，碳酸钡中和，滤液钠硼氢还原，Dowex 50W-×8（H^+）树脂处理，反复加甲醇除硼酸（5次），乙酐-吡啶（1：1）乙酰化，100°C 1小时，减压浓缩至干，再反复加甲苯（3次）减压浓缩至干，溶于氯仿进行GLC和GLC-MS分析。测定条件：SE-54毛细管柱，30m×0.25mm，柱温170—220°C，程序升温170°C定温10分钟，然后5°C/分升至220°C。EI，电子能量70 eV，发射电流0.25mA。结果见表3。

部分酸水解 分别取多糖50mg（Ⅰ），500mg（Ⅱ），50mg（Ⅲ），各加入2M三氟醋酸3ml（Ⅰ），30ml（Ⅱ），3 ml（Ⅲ），90°C水解2小时，反复加水减压蒸干去酸，产物溶于水，用高效薄层板（青岛海洋化工厂）展开，溶剂系统：正丁醇-醋酸-水（2：1：1）。进行薄层扫描，由峰面积比换算出单糖（己糖）、双糖、叁糖、肆糖和伍糖的分子比，结果见表4。多糖Ⅱ的水解产物其寡糖用Bio-Gel p-2凝胶柱（1.8×140 cm）进行分离，水洗脱，流速16—18 ml/h，每管约3ml分部收集。薄层检测，含相同单一点的合并，冰冻干燥。一至五糖均获得单一斑点，而六至十一糖有待深入研究。一至五糖水解，还原，制备成TMS衍生物气相检测，结果见表4。二至五糖甲基化、水解、还原、制备成乙酰化衍生物GLC和GLC-MS分析，结果见表3。结果表明一至五糖中仍含有少量其它同糖数的寡糖。

致谢 本所仪器组进行元素分析、质谱、红外光谱及薄层扫描，中科院化学所陈素明等进行^1H及^{13}C NMR测定。

参 考 文 献

1 胡忠，何静波．植物杂志 1979；（3）：6—7
2 吉占和．植物分类学报 1980；18：427—448
3 江苏新医学院编．中药大辞典．北京：人民出版社，1979：586—590
4 李时珍．本草纲目．北京：人民出版社，1982：1383—1384
5 Kato K, Nitta M, Mizuno. *Agr Biol Chem* 1973; 37: 433—435
6 Lennarz W J, Talamo B. *J Biol Chem* 1966; 241: 2707—2719
7 Gorin P A, Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. New York: Academic press, 1981; vol. 38: 13—104
8 Pless D D, Schmit A S, Lennarz W J. *J Biol Chem* 1975; 250: 1319—1327
9 Jansson P E, Kenne L, Liedgren H et al. *Chem Commun Univ Stockholm* 1976; (8): 75
10 方积年等．生物化学与生物物理学报 1984; 16: 222—227
11 Mccomb E A, Mccready R M. *Anal Chem* 1957; 29: 819—820
12 Keller J M, Ballou C E. *J Biol Chem* 1968; 243: 2905—2910
13 Bradbury A G W, Halliday D J, Medcalf D G. *J Chromatogr* 1981; 213: 146—150
14 Aspinall G O, Ferrier R. *J Chem & Ind* 1957; 1216
15 Akher M A, Smith F. *J Amer Chem Soc* 1952; 74: 4970—4971
16 Hakomori S. *J Biochem* (Tokyo) 1964; 55: 205—208

STUDIES ON POLYSACCHARIDES OF DENDROBIUM CANDIDUM

Wang Shiling, Zheng Guangzhi, He Jingbo, Yu Xuejian, Wu Yu

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming)

Abstract Three polysaccharides, named candiduman I, II and III, have been isolated and purified from *Dendrobium candidum*. They were shown to be homogeneous by electrophoresis and gel chromatography.

According to IR, ^{1}H and ^{13}C NMR, acid hydrolysis and determination of O-acetyl group, they were identified as the O-acetylglucomannan. From the results of Smith degradation, partial acid hydrolysis and methylation analysis, it was concluded that the polysaccharides possessed backbone consisting of repeating some β-(1—3)-linked D-mannopyranosyl residues and one β-(1—4)-linked D-glucopyranosyl residue, and probably possessed branched chains consisting of β-(1—4)-linked D-glucopyranosyl residues and β-pentose end groups. Side chains are attached to 2-, 3-, or 6- of D-glucopyranosyl residues of backbone. Their average molecular weights were estimated to be ca. 1 000 000(I), 500 000(II), 120 000 (III) respectively by gel chromatography.

Key words *Dendrobium candidum*; Polysaccharide; O-acetylglucomannan